

14.01.99 5

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 05 MAR 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 3月31日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第101797号

出 願 人

Applicant (s):

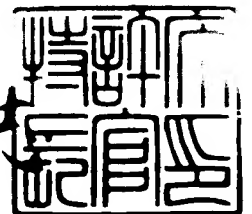
資酒造株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 2月19日

Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



【書類名】 特許願

【整理番号】 1-980328-1

【提出日】 平成10年 3月31日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光殿

【国際特許分類】 A61K 31/11 ADS  
A61K 31/66 ADS

【発明の名称】 アポトーシス誘発用物質

【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 巽 容子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 小山 信人

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078503

【弁理士】

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】

【識別番号】 100087022

【弁理士】

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】

【識別番号】 100089428

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705578

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘発用物質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記 (a)、(b)、(c)、(d) より選択される少なくとも1種の化合物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を加熱処理する工程を包含することを特徴とするアポトーシス誘発用物質の製造方法。

(a) ペントース、

(b) ペントース誘導体、

(c) ペントースを含有する化合物、

(d) ペントース誘導体を含有する化合物。

【請求項2】 ペントース誘導体がデオキシペントースである請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項3】 ペントースがリボースである請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項4】 ペントース誘導体がデオキシリボースである請求項1又は2記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項5】 ペントースを含有する化合物がリボヌクレオシド、リボヌクレオチド又はリボ核酸である請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項6】 ペントース誘導体を含有する化合物がデオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド又はデオキシリボ核酸である請求項1記載のアポトーシス誘発用物質の製造方法。

【請求項7】 下記 (a)、(b)、(c)、(d) より選択される少なくとも1種の化合物（但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を加熱処理することにより得られるアポトーシス誘発用物質。

(a) ペントース、

(b) ペントース誘導体、

(c) ペントースを含有する化合物、

(d) ペントース誘導体を含有する化合物。

【請求項8】 ペントース誘導体がデオキシペントースである請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項9】 ペントースがリボースである請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項10】 ペントース誘導体がデオキシリボースである請求項7又は8記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項11】 ペントースを含有する化合物がリボヌクレオシド、リボヌクレオチド又はリボ核酸である請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項12】 ペントース誘導体を含有する化合物がデオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド又はデオキシリボ核酸である請求項7記載のアポトーシス誘発用物質。

【請求項13】 アポトーシス誘発活性を有するトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを有効成分として含有することを特徴とするトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールに感受性を示す疾病治療用医薬又は予防用医薬。

【請求項14】 医薬が制がん剤である請求項13記載の医薬。

【請求項15】 医薬がアポトーシス誘発剤である請求項13記載の医薬。

【請求項16】 アポトーシス誘発活性を有するトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料。

【請求項17】 トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料。

【発明の詳細な説明】

【図1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発用物質、その製造方法、及び該アポトーシス誘発用物質の医薬、飲食品としての用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死である。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化されることによりプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、またある場合には不活性型として細胞内に存在するプログラム死タンパクが活性化される。こうして生成した活性型プログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは有害な細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発用物質、及びその製造方法を提供し、更には該アポトーシス誘発用物質を有効成分とする医薬、飲食品を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば本発明の第1の発明は下記 (a)、(b)、(c)、(d) より選択される少なくとも1種の化合物 (但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含む化合物を除く) を加熱処理する工程を包含することを特徴とするアポトーシス誘発用物質の製造方法に関する。

(a) ペントース、

- (b) ペントース誘導体、
- (c) ペントースを含有する化合物、
- (d) ペントース誘導体を含有する化合物。

本発明の第2の発明は上記(a)、(b)、(c)、(d)より選択される少なくとも1種の化合物(但し、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く)を加熱処理することにより得られるアポトーシス誘発用物質に関する。

本発明の第3の発明はアポトーシス誘発作用を有するトランス(trans)-4, 5-ジヒドロキシ(dihydroxy)-2-ペンテナール(pentenal)及び／又はトランス(trans)-4-ヒドロキシ(hydroxy)-5-[ホスホノオキシ(phosphonoxy)]-2-ペンテナール(pentenal)を有効成分として含有することを特徴とするトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールに感受性を示す疾病治療用医薬又は予防用医薬に関する。

本発明の第4の発明はアポトーシス誘発作用を有するトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料に関する。

#### 【0005】

本発明者らは(a) ペントース、(b) デオキシリボース等のペントース誘導体、(c) リボヌクレオシド、リボヌクレオチド、リボ核酸等の、ペントースを含有する化合物、(d) デオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸等の、ペントース誘導体を含有する化合物、から選択される少なくとも1種の化合物の加熱により得られる物質ががん細胞に強いマゼ

本発明の目的は

#### 【0006】

【発明の実施形態】

本発明を具体例、説明する。

ペントースは炭素を5個持つ糖の総称であり、アルドペントースとしてはアラビノース、キシロース、リボース、リキソース等が、ケトペントースとしてはリブロース、キシルロース等が天然に存在する。

ペントース誘導体としては、例えばデオキシペントース、ペンチトールが挙げられ、前者ではデオキシリボース、後者ではリビトール、アラビトール、キシリトールが天然に存在する。また、炭素数5のアミノ糖、アルドン酸、アルダル酸等もペントース誘導体であり、合成法等によって得られる。

ペントースを含有する化合物の例としてはペントースリン酸、リボヌクレオシド、リボヌクレオチド等の低分子化合物、リボ核酸、アラビナン、キシラン等の高分子化合物が挙げられる。また、ペントースのエステル、エーテル、配糖体、これらの塩等もペントースを含有する化合物であり、合成法等によって得られる。

ペントース誘導体を含有する化合物の例としては、デオキシペントースを含有するデオキシペントースリン酸、デオキシリボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボ核酸、ペンチトールを含有するリボフラビン、リビトール、ルテイコ酸が挙げられる。また、ペントース誘導体のエステル、エーテル、アミド、配糖体、これらの塩等もペントース誘導体を含有する化合物であり、合成法等で得られる。

#### 【0007】

本発明において上記のペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物の種類は加熱処理によってアポトーシス誘発用物質が生成するものであれば何ら限定はない。また、ペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含有する化合物は動植微生物の細胞から抽出する、発酵法で製造する、化学的に合成する方法で得られるが、これらがいかなる方法で製造されていても加熱処理によってアポトーシス誘発用物質が生成する限り本発明で使用可能である。

本発明ではペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物及び／又はペントース誘導体を含有する化合物の含有物も使用できる。様々なペントース、ペントース誘導体、ペントースを含有する化合物、ペントース誘導体を含



有する化合物が動植物の組織、動植微生物の細胞には含有されているので、これらをそのまま本発明で使用することもできる。なお本発明においてはペントース及び／又はペントース誘導体を含有する化合物からはウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物が除かれる。ウロン酸誘導体とはウロン酸のラクトン、ウロン酸のエステル、ウロン酸のアミド、ウロン酸の塩等である。

# 【0008】

本発明のアポトーシス誘発用物質の製造における加熱処理方法としては、アポトーシス誘発作用を有する物質が得られる条件であれば特に限定はないが、上記(a)～(d)から選択される少なくとも1種の化合物（但しウロン酸及び／又はウロン酸誘導体、及びウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する化合物を除く）を、例えば30～400℃で数秒～数日、好ましくは50～200℃で数秒～24時間加熱処理を行うことにより、本発明のアポトーシス誘発用物質を得ることができる。加熱処理物中には複数のアポトーシス誘発作用を示す物質が生成されており、目的に応じて、pH、時間、温度、原料濃度等の加熱処理条件を変えることにより、希望する物質を有する本発明のアポトーシス誘発用物質を調製することができる。

加熱処理時の原料の濃度はその加熱処理によりアポトーシス誘発用物質が得られる範囲内であれば特に限定は無く、操作性、収率等の点を考慮し設定すれば良い。本発明における加熱処理は湿式加熱でも、乾式加熱でも良い。湿式加熱としては、水蒸気加熱、水蒸気加圧加熱、加圧式加熱等任意の湿式加熱方法を用いることができる。乾式加熱としては、乾燥熱風による直接加熱法、熱源から隔壁を通して加熱する間接加熱法等が使用できる。直接加熱方法としては、気流乾熱法、噴霧乾熱法等があり、間接加熱法としてはドラム乾熱法等が使用できる。また本発明のアポトーシス誘発用物質の原料は通常の、煮る、焼く、炒る、煎じる、

本発明のアポトーシス誘発用物質は、上記(a)～(d)の誘発作用を指標に精製処理を行っても良い。精製手段としては、化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いれば良い。

なお、上記(a)～(d)の精製手段、(e)の精製手段は精製物及び部分精製物も本発明の

ポトーシス誘発用物質に包含される。

【0009】

本発明者らは本発明の加熱処理物中に、バイオケミストリー (Biochemistry)、第35巻、第659～665頁(1996)に記載のトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、第267巻、第14429～14435頁(1992)に記載のトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナール、及びこれらの類縁体が含有されていることを見出し、これらの化合物が制がん作用、アポトーシス誘発作用を示すことを見出した。

したがって、トランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを有効成分とすることにより、トランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールに感受性を示す疾患、例えばがん性疾患、アポトーシス誘発抑制に起因する疾患等の治療用医薬又は予防用医薬を提供することができる。

【0010】

本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればアポトーシス誘発剤を製造することができる。すなわち一般的には、本発明アポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

【0011】

本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールを有効成分として含有するアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールを、希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

#### 【0012】

本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシ-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールを有効成分として含有するアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

#### 【0013】

投与量は、製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有する有効成分の量を基準として、

である。また投与量は種々条件により変動するので上記投与量より

少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明のトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールを有効成分として含有するアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

#### 【0014】

本発明のアポトーシス誘発用物質、トランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及びトランス-4-ヒドロキシー-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールはがん細胞にアポトーシス誘発作用、細胞増殖抑制作用を有し、本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールを有効成分として制がん剤を製造することができる。すなわち、本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-（ホスホノオキシ）-2-ペンテナールを有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。

#### 【0015】

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

制がん剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0016】

本発明のアポトーシス誘発用物質を有効成分とする制がん剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明のアポトーシス誘発用物質の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0017】

本発明のトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを有効成分として含有する制がん剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り0.01～50mg、好ましくは0.1～10mgである。もちろん投与量は種々の条件によって変動するので上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0018】

本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールは、製剤、又は製剤の原料として用いても良い。

本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-

ーペンテナール及び／又はトランスー4ーヒドロキシー5ー（ホスホノオキシ）ー2ーペンテナールを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料は、食品又は飲料中に本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランスー4，5ージヒドロキシー2ーペンテナール及び／又はトランスー4ーヒドロキシー5ー（ホスホノオキシ）ー2ーペンテナールの生理作用を発現するための必要量が含有されておれば良く、本発明の食品又は飲料、例えばアポトーシス誘発用食品又はアポトーシス誘発用飲料、制がん用食品又は制がん用飲料のそれぞれの製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にアポトーシス誘発作用又は制がん作用を有する本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランスー4，5ージヒドロキシー2ーペンテナール及び／又はトランスー4ーヒドロキシー5ー（ホスホノオキシ）ー2ーペンテナールが含有されていれば良い。

【0020】

これらの食品又は飲料としては、アポトーシス誘発作用又は制がん作用を有する本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランスー4，5ージヒドロキシー2ーペンテナール及び／又はトランスー4ーヒドロキシー5ー（ホスホノオキシ）ー2ーペンテナールの有効量が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

【0021】

本発明のアポトーシス誘発用物質、トランスー4，5ージヒドロキシー2ーペンテナール及びトランスー4ーヒドロキシー5ー（ホスホノオキシ）ー2ーペンテナールはその生理活性を有する有効量をマウスに投与しても急性毒性は認められない。

【0022】

本発明の薬剤は生体の恒常性の維持に有用である。また本発明のアポトーシス誘発用物質、又はトランスー4，5ージヒドロキシー2ーペンテナール及び／又はトランスー4ーヒドロキシー5ー（ホスホノオキシ）ー2ーペンテナールを有効成分として使用するアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいは

がん、ウイルス性疾患等と生体の関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。

【0023】

食品又は飲料中に本発明のアポトーシス誘発用物質を含有させることにより、アポトーシス誘発用の食品又は飲料、又は制がん用の飲食品を製造することができる。本発明のアポトーシス誘発用物質を含有する食品又は飲料は、該加熱処理物の有する種々の生理活性、すなわちアポトーシス誘発作用、制がん作用等によって、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果を有する健康食品又は飲料であり、生体の恒常性の維持、特に胃腸健康維持に有用な食品又は飲料である。

【0024】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

【0025】

実施例 1

1M L(+)-アラビノース(和光純薬社製、010-04582)水溶液、1M D(-)-アラビノース(和光純薬社製、013-04572)水溶液、1M D(+)-キシロース(ナカライテスク社製、367-19)水溶液、D-リボース(ナカライテスク社販売、302-10)水溶液のpHは順に5.3、4.9、4.4、4.7であった。

これらを121℃で4時間加熱処理し、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に対するアポトーシス誘発活性を次のように測定した。

加熱処理した加熱物を、滅菌水で2倍、4倍、8倍に希釈し、滅菌水、アポトーシス誘発活性の試料を調製した。これらの試料を滅菌蒸留水で2倍、4倍、8倍に希釈し、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60に接種し、細胞増殖抑制活性を次のように測定し、アポトーシス誘発活性の強さを比較した。

較した。

すなわち各希釈液10 $\mu$ l又は滅菌蒸留水10 $\mu$ lをそれぞれ96穴マイクロタイタープレートのウェルに入れた。そこに5000個のHL-60細胞(ATCC CCL240)を含む10% ウシ胎児血清(ギブコ社製)含有RPMI 1640培地(ニッスイ社製) 90 $\mu$ lを加え、5% 炭酸ガス存在下37℃で48時間培養した。5mg/mlの3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT; シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10 $\mu$ lを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロパノール 100 $\mu$ lを加えてよくかくはんし、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした(MTT法)。

#### 【0026】

その結果、非加熱のL(+)-アラビノース水溶液、D(-)-アラビノース水溶液、D(+)-キシロース水溶液及びD-リボース水溶液添加区分においては対照の水添加区分と細胞増殖の違いが認められず、アポトーシス誘発活性が認められなかった。一方、121℃で4時間加熱処理したL(+)-アラビノース水溶液、D(-)-アラビノース水溶液、D(+)-キシロース水溶液、D-リボース水溶液の、各々4倍、4倍、8倍、16倍希釈液添加区分において検鏡によって細胞の変形が見られ、590nmにおける吸光度が水添加の対照と比べて減少していたことから細胞増殖抑制活性が認められた。

#### 【0027】

##### 実施例2

1M 2-デオキシ-D-リボース(シグマ社製、D2751)水溶液と0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液のpHはそれぞれ4.7、5.4であった。0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液の一部を取り、1N NaOHでpH7.1に調整した。これらを121℃で4時間加熱処理し、HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を実施例1の方法で測定した。なお、希釈倍率は2倍、4倍、8倍、16倍、32倍、64倍及び128倍とした。

その結果、非加熱の2-デオキシ-D-リボース水溶液添加区分においては対



照の水添加区分と細胞増殖の違いが認められず、アポトーシス誘発活性が認められなかった。一方、121℃で4時間加熱処理した1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液、0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液（pH未調整）、0.1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液（pH7.1）の各々、128倍、16倍、16倍希釈液添加区分において細胞増殖の抑制が認められた。

【0028】

実施例3

0.25mg/ml デオキシリボ核酸（DNA）ナトリウム塩（和光純薬社製、047-22491）水溶液のpHは8.9であった。この一部を取り、1N HClでpH7.3に調整した。これらを121℃で4時間加熱処理し、HL-60細胞に対する細胞増殖抑制活性を実施例1の方法で測定した。なお、希釈倍率は2倍、4倍、8倍、16倍及び32倍とした。

その結果、121℃で4時間加熱処理したDNAナトリウム塩水溶液（pH未調整）、DNAナトリウム塩水溶液（pH7.3）の、各々8倍、16倍希釈液添加区分において590nmにおける吸光度が水添加の対照に比べて減少しており、細胞増殖抑制活性が認められた。

【0029】

実施例4

（1）実施例2で得た1M 2-デオキシ-D-リボース水溶液の121℃、4時間加熱処理物を以下の逆相HPLCで分離した。

試料注入量：40μl

カラム：YMC-Pack ODS-AM（4.6×250mm、ワイエムシー社製）

移動相A：水

（2）

溶出：移動相A（5分間）→移動相AからBへの直線濃度勾配（20分間）→

移動相B（5分間）

検出：254nm、UV吸収検出器

2分ごとに分取した各画分を減圧下濃縮し、実施例1の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定した。この結果、画分4（保持時間6分～8分）に強い活性、画分8（保持時間14分～16分）に弱い活性が認められた。

#### 【0030】

(2) 実施例4-(1)の逆相HPLCを繰り返して画分4の乾燥物を調製した。本試料の質量分析をDX302（日本電子社製）を用いて行った。また、本試料を重ジメチルスルホキシドに溶解してJNM-A500（日本電子社製）を用いて核磁気共鳴スペクトルを測定した。この結果、本試料の物性値はトランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールと一致し、本試料がトランス-4,5-ジヒドロキシ-2-ペンテナールであることが明らかになった。

本試料は強いアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を示した。

#### 【0031】

##### 実施例5

実施例3で得たDNAナトリウム塩加熱処理物（pH7.3調製後加熱処理物）を実施例4-(1)と同様の逆相HPLCで分離したところ画分5（保持時間8分～10分）に強い活性、画分9（保持時間16分～18分）に弱い活性が認められた。この逆相HPLCを繰り返して画分5の乾燥物を得た。本試料の質量分析と核磁気共鳴スペクトルの測定を実施例4-(2)と同様に行った。この結果、本試料はトランス-4-ヒドロキシ-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールであることが明らかになった。

また本試料は強いアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を示した。

#### 【0032】

##### 実施例6 注射剤

実施例1記載のD-リボースの加熱処理物の中和物の濃縮乾固物を注射用蒸留水に溶解し、1%溶液を調製した。この溶液を凍結乾燥用バイアル瓶1バイアル中に、上清画分の乾燥物換算で10mg充てんし、凍結乾燥を行った。別に溶解液として生理食塩水2mlを添加した。

同様に実施例2記載の2-デオキシ-D-リボースの加熱処理物を用い注射剤

を調製した。

【0033】

# 実施例 7 錠剤

下記処方に従い錠剤を調製した。

DNAナトリウム塩加熱処理物	10mg
コーンスターチ	65mg
カルボキシメチルセルロース	20mg
ポリビニルピロリドン	3mg
ステアリン酸マグネシウム	2mg
1錠当り	計 100mg

実施例 3 記載の DNA ナトリウム塩加熱処理物の凍結乾燥物を使用した。

【0034】

## 【発明の効果】

本発明によればアポトーシス誘発作用を有し、がん性疾患においてがん細胞にアポトーシスを誘発し、該疾患の予防、治療に有効なアポトーシス誘発用物質が提供される。とりわけ大腸がん、胃がん等消化器系のがんの場合、本発明のアポトーシス誘発用物質を食品、飲料として経口的に摂取することによりがん細胞にアポトーシスを起こさせることができるため本発明のアポトーシス誘発用物質を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は消化器系がんの治療、予防に優れた効果を有している。本発明のアポトーシス誘発用物質を有効成分として含有する薬剤はがん細胞等の異常増殖細胞にアポトーシス誘発作用を有し、生体の恒常性の維持に極めて有用である。

本発明のアポトーシス誘発用物質は食品を原料として安価に大量に供給可能である。また、本発明のアポトーシス誘発用物質を有効成分として使用する薬に

機構 本発明のアポトーシス誘発用物質の開発等を行うことにより、

また本発明においてアポトーシス誘発作用を有するトランス-4,5-ジヒドロキシ-2,3-ヘキソキサン酸誘導体は、がん性疾患の治療に有効である。

また、本発明のアポトーシス誘発用物質を有効成分とする医薬が提供され、該医薬はがん

疾患等の難治性の疾患の治療、予防に極めて有用である。

また本発明においてアポトーシス誘発作用を有するトランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール及び／又はトランス-4-ヒドロキシー-5-(ホスホノオキシ)-2-ペンテナールを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料が提供され、該食品又は飲料はがん疾患等の難治性の疾患の予防や症状改善に有用なアポトーシス誘発用、制がん用の機能性食品又は飲料である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 医薬、飲食品の分野で有用なアポトーシス誘発用物質、その製造方法及び該アポトーシス誘発用物質を有効成分とする医薬、飲食品を提供する。

【解決手段】 ペントース若しくはその誘導体、又はそれらを含有する化合物（ウロン酸関連化合物を除く）を加熱処理することにより得られるアポトーシス誘発用物質。該加熱処理工程を包含する該物質の製造方法。トランス-4, 5-ジヒドロキシー-2-ペンテナール、又はその5-モノホスフェートを有効成分とする医薬、あるいはそれを含有、希釈及び／又は添加してなる食品又は飲料。

【選択図】 なし

特平 10-101797

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 591038141  
【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹中町609番地  
【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100078503  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7  
階 さやか特許事務所

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100087022  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7  
階 さやか特許事務所

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100089428  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7  
階 さやか特許事務所

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591038141]

1. 変更年月日

1991年 2月 4日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名

寶酒造株式会社

